

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN COMBINADA DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES Y PSEUDOMONAS PUTIDA EN PLANTAS DE TOMATE DE ÁRBOL (SOLANUM BETACEUM) INFECTADAS CON MELOIDOGYNE SPP.”

Ramírez Ibeth Fernanda¹, Ulloa Santiago Miguel², Medina María Emilia¹

¹Laboratorio de Microbiología del Suelo
Centro de Investigaciones Científicas
Escuela Politécnica del Ejército
Sangolquí, Ecuador.

²Carrera de Ingeniería Agropecuaria
Escuela Politécnica del Ejército
Santo Domingo, Ecuador.

RESUMEN

A pesar de haberse incrementado el área del cultivo de tomate de árbol en Ecuador, este cultivo no ha aumentado su producción debido, al ataque del nematodo *Meloidogyne* spp. que causa pérdidas de hasta un 70% y reduce la vida útil de la planta. La gravedad del problema y las dificultades que implican el manejo de químicos para su control, promueve la implementación de métodos de control biológico como la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR). Estas técnicas, permiten una agricultura respetuosa con el ambiente. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la inoculación combinada de HMA y dos cepas de *P. putida*, en el daño y la infección causadas por nematodos en plantas de tomate de árbol. Para obtener el inóculo micorrízico se aislaron y propagaron esporas nativas. La selección de las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se realizó de acuerdo a su capacidad de solubilización de fosfatos, producción de ácido indol acético (AIA) y ácido cianhídrico (HCN). Las plantas fueron inoculadas con 2500 esporas de HMA al momento del trasplante, después de 15 días se adicionó 20 ml del inóculo bacteriano (1.5×10^8 UFC/ml) y a los 35 días se aplicaron los nematodos (2000/planta). La evaluación final se realizó 60 días después de la inoculación con nematodos. En términos de desarrollo los beneficios de la aplicación de ambos microorganismos benéficos se evidencian en el aumento de la biomasa radical, longitud radical, perímetro del tallo y área foliar, alcanzando el mayor desarrollo con la aplicación combinada, en ausencia del patógeno. Este efecto positivo fue también observado en los tratamientos con nematodos, donde el mejor desarrollo de biomasa aérea, altura y longitud radical se alcanza con la interacción HMA- *P. putida*. La aplicación de HMA y la cepa P1 causó la mayor reducción del agallamiento y de la reproducción del nemátodo en comparación a la aplicación individual de los microorganismos benéficos y el control. Nuestros estudios sugieren que existe un sinergismo entre HMA y ambas cepas de *P. putida*, que favorece el desarrollo de las plantas de tomate de árbol y reduce la infección causada por el nematodo agallador de raíz.

ABSTRACT

Despite having increased the area of the tree tomato cultivation in Ecuador, this crop has increased production due to the attack of the nematode *Meloidogyne* spp. causing losses of up to 70% and reduces the lifetime of the plant. The severity of the problem and the difficulties involved in handling chemicals for control, promotes the implementation of biological control methods and the application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and growth promoting rhizobacteria (PGPR). These techniques allow the environment-friendly agriculture. The objective of this study was to determine the combined effect of AMF inoculation and two strains of *P. putida* in damage and nematode infection in tomato tree. For mycorrhizal inoculum spores

were isolated and propagated native. The selection of the bacterial strains used in this study was performed according to their ability of solubilizing phosphates, producing indole acetic acid (IAA) and hydrocyanic acid (HCN). Plants were inoculated with 2500 spores at transplanting HMA after 15 days was added 20 ml of the bacterial inoculum (1.5×10^8 CFU/ml) and applied 35 days nematodes (2000/planta). The final evaluation was done 60 days after inoculation with nematodes. In terms of development gains from the application of both beneficial microorganisms are evident in the increased root biomass, root length, stem perimeter and leaf area, reaching the largest combined with application development, in the absence of the pathogen. This positive effect was also observed in the treatments with nematodes, where the best development of biomass, height and root length is achieved through the interaction HMA-P. putida. The application of HMA and P1 strain caused the greatest reduction in galling and nematode reproduction compared to the individual application of beneficial microorganisms and control. Our studies suggest that there is synergism between HMA and both strains of *P. putida* that favors the development of tree tomato plants and reduces infection by root-knot nematode.

1 INTRODUCCIÓN

En el Ecuador el tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es comercializado en el mercado local por pequeños agricultores sirviendo de sustento económico para varias familias. Este cultivo es afectado por el nematodo agallador de raíz (*Meloidogyne* spp.) que causa pérdidas de hasta un 70 % y reduce hasta dos años la vida útil de la planta (INIAP 2008). Los nematodos causan grandes pérdidas debido a que se alimentan del citoplasma, provocando hipertrofia de los tejidos, formando agallas que limitan el desarrollo de la planta, la debilitan, deshidratan y la vuelven más susceptible a patógenos como *Fusarium* spp. y *Phytophthora infestans* (Abad et al., 2003).

Debido a la ausencia de alternativas tecnológicas amigables con el medio ambiente y la salud, el 95% de los agricultores utilizan productos prohibidos en otros países para el control químico del nematodo (Soria, 1995). El beneficio de los nematicidas químicos es temporal, pero los efectos adversos son mayores porque afectan a la salud y se bio-acumulan en la cadena trófica. Además, su uso ocasiona desbalances ecológicos eliminando microorganismos benéficos antagonistas a los nematodos que afectan la mineralización de nutrientes (Barea et al., 1998).

El uso incorrecto de nematicidas disminuye las posibilidades de exportación, ya que las exigencias internacionales demandan un manejo sostenible (FAO, 1991). Con la aplicación de técnicas biotecnológicas es factible reemplazar productos químicos por biológicos, a través del uso de microorganismos de la rizósfera como HMA y rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR).

Ciertos microorganismos ampliamente distribuidos como hongos de la clase Zygomycetos, tienen la capacidad de asociarse simbióticamente a las raíces de plantas vasculares dando origen a la asociación micorrícica arbuscular (Smith & Read, 1997). Esta asociación mejora la productividad de los cultivos porque capta nutrientes poco disponibles en el suelo como el fósforo, aumenta la tolerancia al ataque de patógenos y condiciones de estrés biótico y abiótico. Además, mejora y restaura la fertilidad del suelo al explorar un volumen mayor, porque sus hifas aumentan el área de superficie de absorción (Azcón & Barea, 1996).

Las PGPR son microorganismos que se encuentran o no asociados a diversos tejidos vegetales. Tienen la capacidad de adaptarse, colonizar y permanecer en la rizósfera de la planta proporcionando beneficios para su crecimiento, incrementando la solubilidad de elementos minerales, fijando nitrógeno atmosférico, reduciendo patógenos de las raíces (por antagonismo o competencia) y produciendo sustancias reguladoras del crecimiento vegetal (giberelinas, auxinas y citoquininas). Son consideradas PGPR los géneros *Arthrobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., y *Azospirillum* sp. (Tenuta, 2004).

A pesar de que no hay investigaciones sobre la aplicación de HMA y *P. putida* en plantas de tomate de árbol, existen varios trabajos en otros cultivos de interés agrícola (tomate, banano, papaya, garbanzo) donde se ha reportado el efecto del sinergismo benéfico al co-inocular HMA y PGPR (Jaizme, Rodríguez & Barroso, 2006; Rodríguez, Badosa, Montesinos & Jaizme, 2007; Siddiqui & Mahmood 1998, 2001).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la inoculación combinada de hongos micorrícicos arbusculares y rizobacterias promotoras de crecimiento (*Pseudomonas putida*) en plantas de tomate de árbol infectadas con el nematodo agallador de raíces *Meloidogyne* spp.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención del inóculo micorrícico

Para la obtención del inóculo de HMA se seleccionaron 20 esporas a partir de cultivos de tomate de árbol de la parroquia de Huambaló, que se sembraron en cajas petri con arena estéril y plantas de avena (*Avena sativa*) durante un mes. Posteriormente, las esporas se propagaron en plantas de pasto (*Lolium perenne*) en un sustrato con tierra negra, turba y cascarilla de arroz. Los cultivos se mantuvieron durante cinco meses y finalmente se obtuvo un inóculo de 12 esporas/gr.

2.2 Selección del inóculo bacteriano

Las dos cepas de *P. putida* utilizadas como inóculo se seleccionaron a partir de siete aislados (proporcionados por el Laboratorio de Microbiología del suelo CEINCI, ESPE) en base a su capacidad para producir metabolitos relacionadas con el crecimiento vegetal y su antagonismo contra patógenos. La cepa P1 solubilizó fosfatos y produjo ácido cianhídrico (HCN) y la cepa P2 produjo ácido indol acético (AIA).

El inóculo de ambas cepas de *P. putida* se desarrolló a partir de cultivos axénicos en agar nutritivo y consistió en una suspensión bacteriana sobre solución salina estéril (NaCl 0.85%) que se ajustó a una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml. El inóculo bacteriano se aplicó 15 días después de la inoculación con HMA. Los tratamientos que no contenían bacterias fueron regados con 20 ml de solución salina estéril 0.85 %.

2.3 Preparación del inóculo de nematodos

El inóculo de nematodos, se obtuvo a partir de muestras de raíces de tomate de árbol (que presentaron agallamiento) ubicados en el Cantón Pimampiro. La extracción de nematodos se realizó según la técnica propuesta por Sttemirding (1964) citado por Zuckerman, *et al.* (1985) y se propagó en plantas de tomate riñón (*Lycopersicum esculentum*) variedad *Sheila Victory*. El inóculo de nematodos se ajustó hasta obtener 20 ml de una suspensión de 2000 nematodos/planta y se aplicó 20 días después del inóculo bacteriano. A los tratamientos que no tenían nematodos, se les aplicó 20 ml de agua destilada.

2.4 Diseño experimental e inoculación

Se estableció un ensayo con 12 tratamientos generados a través de un diseño completamente al azar y un arreglo factorial 2x3x2 a partir de la interacción de tres factores: dosis de micorrizas (0, y 210 g), concentración de *P. putida* (0, cepa P1, cepa P2) y

Meloidogyne spp. (0 y 2000 nematodos). Se realizaron 12 repeticiones por tratamiento (unidad experimental: 1 planta. Total 144 plantas).

La inoculación de HMA se llevó a cabo en el transplante de las plantas de tomate de árbol a maceta. Después de 15 días, se realizó la aplicación bacteriana (20 ml/planta) y luego de 35 días, se aplicaron 2000 nematodos/planta.

2.5 Evaluación de las variables

Tras un periodo de 95 días a partir del inicio del ensayo se realizó la evaluación final de las variables de desarrollo. Se determinó la población final de esporas de HMA con la técnica de Genderman y Nicholson, 1963 (citada y modificada por Herrera *et al.*, 2004) el porcentaje de colonización micorrícica según Philips y Hayman, 1970 y la población final de bacterias en raíces de tomate de árbol, mediante diluciones seriadas en agar nutriente.

El análisis de los resultados de las variables mencionadas se realizó mediante el Software Estadístico InfoStat utilizando ADEVA con una prueba de comparación de medias DGC al 5%.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Desarrollo de las plantas de tomate de árbol

A pesar de que no hay investigaciones sobre la aplicación de HMA y *P. putida* en plantas de tomate de árbol, existen varios trabajos en otros cultivos de interés agrícola (tomate, banano, papaya y garbanzo) donde se ha reportado el efecto del sinergismo benéfico al co-inocular HMA y PGPR (Jaizme, *et al.*, 2006; Rodríguez-Romero *et al.*, 2007; Siddiqui y Mahmood 1998, 2001). Los autores sugieren que el uso combinado de los agentes de biocontrol, pueden disminuir el daño producido por el patógeno, pues sus mecanismos de acción combinados les confieren un efecto antagónico, aditivo o sinérgico. Además, la interacción de micorrizas y rizobacterias es inevitable durante el proceso de colonización, ya que comparten microhábitats comunes (Barea *et al.*, 1997) y la inoculación temprana de los microorganismos benéficos, puede garantizar la protección de la planta previniendo la penetración y reproducción del nematodo, especialmente en las primeras etapas del cultivo (Siddiqui y Mahmood 2001). Estas situaciones serán consideradas para explicar los posibles efectos simbióticos de los microorganismos benéficos sobre el desarrollo vegetal y la infección ocasionada por los nematodos en plantas de tomate de árbol.

El análisis de nuestros resultados en los tratamientos sin nematodos, muestra de forma general que el mayor desarrollo de la biomasa radical, longitud radical, perímetro del tallo y área foliar fue registrado con la combinación HMA-PGPR, permitiendo alcanzar los mayores valores en las variables mencionadas (Tabla 1). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Siddiqui y Mahmood (2001), al aplicar PGPR (*P. fluorescens*, *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*) y *G. mosseae* en plantas de garbanzo, encontraron que el uso combinado de *P. fluorescens* y *G. mosseae* fue mejor en cuanto al desarrollo, que cualquier otra combinación o la aplicación individual de los microorganismos. En otros estudios Siddiqui *et al.* (2009) al inocular plantas de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) con PGPR (*Burkholderia cepacia*, *Bacillus subtilis*) y HMA (*Glomus intraradices*, *Gigaspora margarita*) reportaron un mayor desarrollo de las plantas co-inoculadas con ambos microorganismos respecto a los tratamientos de inoculación simple y al grupo control. Nuestros resultados sugieren que hay un mayor efecto sinérgico de las cepas bacterianas (productoras de AIA, HCN y solubilizadoras de fosfato) y HMA en cuanto al desarrollo de plantas de tomate de árbol en ausencia del patógeno (Tabla 1).

Al analizar la evaluación de los parámetros de desarrollo de los tratamientos con *Meloidogyne* spp. en nuestro ensayo se observa que la aplicación de HMA y *P. putida* influye positivamente sobre el desarrollo de las plantas en biomasa aérea, altura y longitud radical (Tabla 1). Nuestros resultados son similares a los descritos por Jaizme *et al* (2006) quienes inocularon dos especies de HMA (*Glomus mosseae*, *Glomus manihotis*) y un consorcio de *Bacillus* en plantas de papaya (infectadas con *Meloidogyne incognita*) y observaron que las plantas tratadas con ambos microorganismos incrementan los beneficios en comparación a la aplicación simple. En estos estudios se registraron mejoras significativas en variables como peso aéreo, largo de raíz y altura. De igual forma Siddiqui y Mahmood (2001) concluyeron que el uso combinado de *P. fluorescens* con *G. mosseae* fue mejor que la aplicación individual, resultando en una mayor altura y biomasa aérea en plantas de arveja infectadas con *Meloidogyne javanica*.

Tabla 1 Efecto de la interacción simple y combinada de HMA y *Pseudomonas putida* sobre el desarrollo de plantas de tomate de árbol

Tratamiento	B. radical (g)	B. Aérea (g)	L. radical (cm)	Altura (cm)	Perímetro (cm)	A.Foliar (cm ²)
H0P0M0	7.19 a	8.57 b	28.01 b	21.89 a	1.95 b	47.67 b
H0P1M0	13.15 b	10.62 b	30.33 b	22.15 a	1.97 b	57.42 b
H0P2M0	13.38 b	10.98 b	32.67 c	22.40 a	2.03 b	62.75 b
H1P0M0	14.43 b	11.11 b	33.09 c	23.22 a	2.09 a	67.42 b
H1P1M0	15.98 c	11.83 b	33.67 c	24.31 a	2.17 a	68.67 b
H1P2M0	16.88 c	12.44 b	38.42 d	24.40 a	2.20 a	81.25 a
H0P0Mi	4.97 a	6.62 a	24.00 a	17.80 b	1.68 c	45.08 b
H0P1Mi	5.28 a	9.80 b	26.50 b	20.98 a	1.83 c	53.64 b
H0P2Mi	5.44 a	9.91 b	24.08 a	20.74 a	1.81 c	53.64 b
H1P0Mi	5.25 a	9.84 b	24.37 a	20.68 a	1.82 c	49.33 b
H1P1Mi	5.93 a	11.29 b	29.86 b	21.86 a	1.85 c	59.50 b
H1P2Mi	5.88 a	11.81 b	29.17 b	21.68 a	1.84 c	56.08 b

H0: Sin HMA, **H1:** Con HMA, **P0:** Sin *P. putida*, **P1:** Cepa 1 de *P. putida*, **P2:** Cepa 2 de *P. putida*, **M0:** Sin nematodos, **Mi:** Con nematodos.

Medias de doce repeticiones. Dentro de la misma columna letras distintas indican diferencias significativas según el test DGC ($p \leq 0.05$)

3.1.1 Biomasa aérea

En la Figura 1 se observa que en los tratamientos con *Meloidogyne* spp. existen diferencias estadísticas significativas cuando se aplicaron micorrizas y bacterias de forma dual o simple, respecto al tratamiento simple con nematodos. Es decir, que la aplicación de los microorganismos benéficos, tanto de forma individual o combinada, aumentan la biomasa aérea en todos los tratamientos.

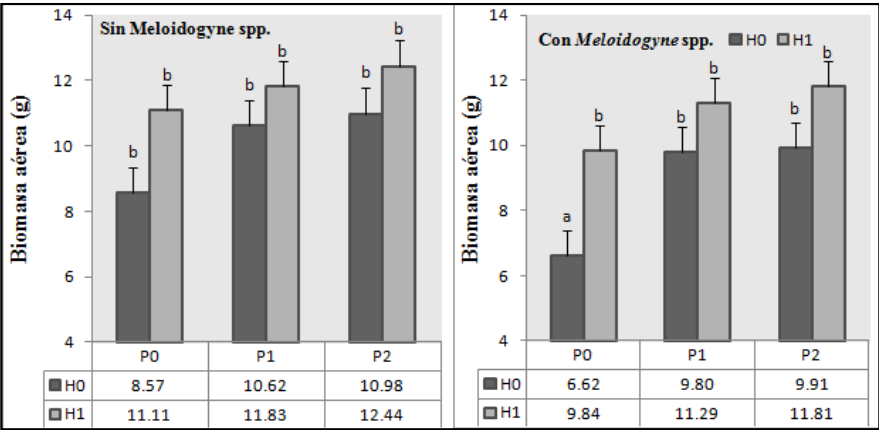


Figura 1 Efecto de la interacción entre HMA y *P. putida* en la biomasa aérea de plantas de tomate de árbol infectadas con *Meloidogyne* spp.

3.1.2 Biomasa radical

En la Figura 2, se observa que en los tratamientos sin *Meloidogyne* spp. la prueba DGC generó tres subconjuntos, donde la aplicación combinada de HMA y bacterias causa el mayor desarrollo de la biomasa radical, seguido por la aplicación individual de los microorganismos benéficos, mientras que el menor desarrollo se da en las plantas control. La interacción entre HMA y la cepa P2 duplica esta variable (16.88 g) en comparación al control (7.19 g).

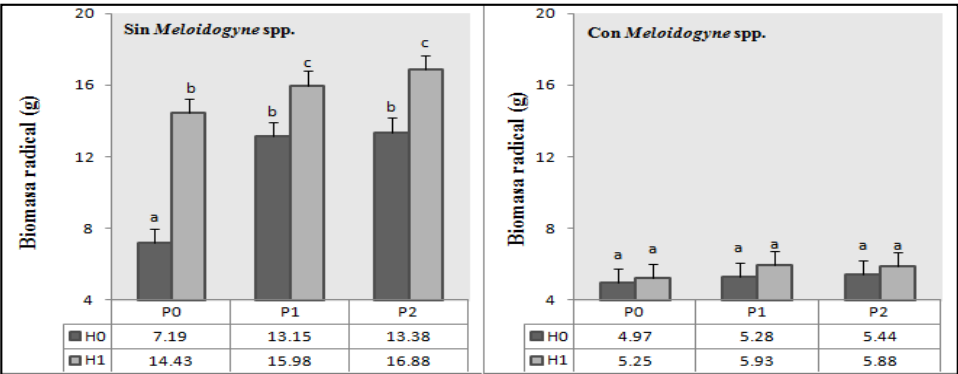


Figura 2 Efecto de la interacción entre HMA y *P. putida* en la biomasa radical de plantas de tomate de árbol infectadas con *Meloidogyne* spp

3.1.3 Longitud radical

En los tratamientos con *Meloidogyne* spp. la inoculación dual de micorrizas - bacterias y la aplicación individual de la cepa P1, presentaron diferencias estadísticas significativas en relación al resto de tratamientos, alcanzando el mayor desarrollo de la longitud radical cuando se aplicó HMA y la cepa bacteriana P1 en comparación al tratamiento con nematodos (Figura 3).

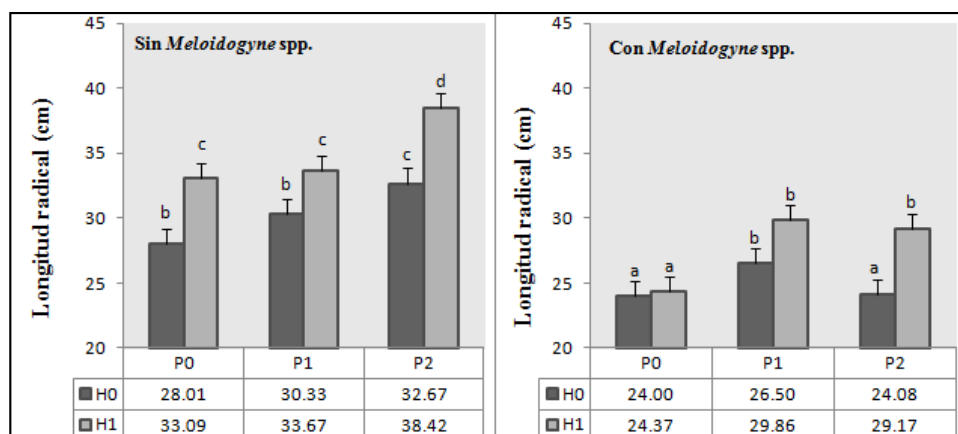


Figura 3 Efecto de la interacción entre HMA y *P. putida* en la longitud radical de plantas de tomate de árbol infectadas con *Meloidogyne* spp.

Cuando no se aplicó *Meloidogyne* spp., la co-inoculación de micorrizas y la cepa P2 produjo el mayor desarrollo de la longitud radical, seguido de los demás tratamientos con microorganismos benéficos. Cabe señalar que el menor desarrollo de la longitud radical corresponde a los tratamientos control (Figura 3).

Los resultados alcanzados en la presente investigación podrían deberse a:

- A. La producción de AIA, que produce la cepa P2, posiblemente debido a que podría aumentar las síntesis de este compuesto por efectos sinérgicos con otros microorganismos. De este modo, el AIA disponible en la planta, desencadenaría efectos hormonales, promoviendo la síntesis de proteínas, la división y el alargamiento celular, produciendo el crecimiento de diferentes órganos de la planta (Tenuta, 2004).
- B. La solubilización de fosfatos que produce la cepa P1 utilizada en este estudio, presenta capacidad de producir fosfatasas o ácidos orgánicos (ácido fórmico, propiónico, glicólico, láctico, fumárico y succínico) solubilizando formas orgánicas e inorgánicas no disponibles en la solución del suelo (Hernández *et al.*, 2006). Barea *et al* (1998) reportaron que ciertas cepas de *P. fluorescens* y *putida* al solubilizar elementos poco móviles del suelo como el fósforo, mejoran el ingreso de este hacia la planta y promueven su desarrollo, lo que resulta en una mayor producción de biomasa, lo cual concuerda con nuestros resultados, donde el desarrollo de la biomasa aérea y radical, se ve favorecido con la aplicación de *P. putida*, tanto de manera individual como en combinación con HMA (Tabla 1).

3.2 Reproducción del nematodo

La reproducción de *Meloidogyne* spp. fue menor en todas las plantas inoculadas con agentes biológicos en comparación a las plantas tratadas únicamente con nematodos, con diferencias altamente significativas en presencia de HMA-P1 en comparación al resto de tratamientos (Tabla 2).

La aplicación conjunta HMA-P1 causa la mayor reducción de nematodos (40 %), seguido por la interacción HMA-P2. En las inoculaciones individuales, la cepa P1 produjo mayor reducción (23 %) seguido de la cepa P2 y finalmente micorrizas, en relación a las plantas tratadas con nematodos

En la co-inoculación se produjo el menor agallamiento (disminuyó 2 veces, 1.83) con HMA-P1 seguido por la interacción HMA-P2.

Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden deberse a:

- A. La producción de metabolitos secundarios como el HCN sintetizado por la cepa P1 utilizada en el presente estudio, sin descartar la posibilidad de que se produzcan otros metabolitos como antibióticos o sideróforos. La cepa P1 que produjo HCN, es antagonista de varios fitopatógenos como nematodos (Schippers *et al.*, 1990; Jayaprakashvel *et al.*, 2010) provocando un estrés en las plantas, que modifica su metabolismo para generar mecanismos de resistencia sistémica que la ayudan a tolerar el ataque de fitopatógenos del suelo. El proceso que provocan estas bacterias en las plantas, involucra la inhibición de la oxidación del citocromo en el proceso de respiración, retrasando la oxidación de electrones NADH en la mitocondria y reduciendo los niveles de respiración (Schippers *et al.*, 1990; Kloepper *et al.*, 1997).
- B. La inducción de resistencia sistémica por ciertas cepas de PGPR (*Pseudomonas putida* y *fluorescens*) puede proteger a la planta potenciando sus defensas innatas contra el ataque biótico, que es efectivo contra una gran variedad de patógenos (Bowen y Rovira, 1999). Las bacterias de este género son capaces de inducir resistencia por parte de la planta, incrementando la velocidad de la síntesis y los niveles de fitoalexinas, implicados en la defensa de la planta. La señal responsable de la inducción de resistencia y del aumento en la acumulación de fitoalexinas está inducida por los lipopolisacáridos de la bacteria (Choudhary *et al.*, 2007).
- C. Los HMA que al colonizar al huésped, inducen las defensas de la planta desencadenando una respuesta débil y transitoria que la sensibiliza frente al ataque de patógenos, lo cual le permite incrementar la síntesis de compuestos de defensa como fenólicos, fitoalexinas, proteínas PR, quitinasas y glucanasas (Wehner *et al.*, 2009). Además, producen una mayor lignificación de las paredes celulares, que dificulta la penetración del nematodo (Tahat *et al.*, 2010). Siddiqui y Akhtar (2006) atribuyen a estos mecanismos de los HMA el éxito de la interacción entre *Glomus mosseae* y *Gigaspora margarita* vs *Meloidogyne incognita* en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) pues disminuyen el daño y la reproducción del nematodo. Por otra parte el desarrollo de HMA y patógenos radicales depende de los fotosintatos de la planta huésped, debido a que ambos compiten por los componentes carbonados producto de la fotosíntesis, así la mayor demanda de carbono por parte de los HMA puede inhibir el desarrollo del nematodo (Tahat *et al.*, 2010). Jaizme-Vega *et al.* (1997) al realizar estudios en plataneras micorrizadas y *Meloidogyne* spp, comprobaron que después de un largo periodo de convivencia en la raíz, la reproducción del nematodo se ve afectada negativamente, mientras que la colonización micorrícica permanece inalterable. Esto sugiere que la micorrización es efectiva contra el ataque del patógeno si ha sido previamente establecida porque así los HMA tienen acceso primario a los productos carbonados sintetizados por la planta.

Tabla2 Reproducción de *Meloidogyne* spp. en plantas de tomate de árbol inoculadas con HMA y PGPR

Tratamiento	Nematodos/g raíz	Población final de nematodos	Tasa de Reproducción	Índice de Agallamiento
H0P0Mi	6578 e	32692 d	16.35 d	4.00 d
H1P0Mi	5977 d	31379 d	15.70 d	3.00 c
H0P2Mi	4888 c	26590 c	13.30 c	2.92 c
H0P1Mi	4767 c	25169 b	12.58 b	2.75 c
H1P2Mi	4066 b	23908 b	11.95 b	2.18 b
H1P1Mi	3322 a	19699 a	9.85 a	1.83 a

Tasa de reproducción= población final/ población inicial .

Dentro de la misma columna letras distintas indican diferencias significativas según el test DGC ($p \leq 0.05$). **H0**: Sin HMA, **H1**: Con HMA, **P0**: Sin *P. putida*, **P1**: Cepa 1 de *P. putida*, **P2**: Cepa 2 de *P. putida*, **Mi**: *Meloidogyne* spp.

3.3 Población final micorrícica y bacteriana

En la Tabla 3, se presenta la evaluación de la población final de HMA, y *Pseudomonas putida* en plantas de tomate de árbol, observándose que los valores de las variables antes mencionadas disminuyen en presencia de *Meloidogyne* spp. En todos los tratamientos en los que se aplicó HMA y PGPR (P1 y P2) las micorrizas promovieron el crecimiento de la población de bacterias.

Tabla 3 Población de esporas de HMA, porcentaje de colonización micorrícica y población bacteriana en plantas de tomate de árbol 60 días después de la inoculación con nematodos.

Tratamiento	UFC/gr raíz <i>P. putida</i>	Esporas/g suelo HMA	% de Colonización HMA
H0P0M0	0.0E+00	-	-
H0P1M0	2.0E+05	-	-
H0P2M0	2.6E+05	-	-
H1P0M0	0.0E+00	29.64 b	63.33 b
H1P1M0	2.6E+05	32.45 b	65.33 b
H1P2M0	2.9E+05	37.95 a	73.67 a
H0P0Mi	0.0E+00	-	-
H0P1Mi	1.7E+05	-	-
H0P2Mi	1.5E+05	-	-
H1P0Mi	0.0E+00	17.87 c	43.00 c
H1P1Mi	2.3E+05	23.11 c	46.67 c
H1P2Mi	2.4E+05	19.20 c	44.67 c

Dentro de la misma columna letras distintas indican diferencias significativas.

Según el test DGC ($p \leq 0.05$). **H0**: Sin HMA, **H1**: Con HMA, **P0**: Sin *P. putida*, **P1**: Cepa 1 de *P. putida*, **P2**: Cepa 2 de *P. putida*, **M0**: Sin nematodos, **Mi**: Con nematodo.

Tanto el número de esporas por gramo de suelo como el porcentaje de colonización micorrícica (Tabla 3) en tratamientos con *Meloidogyne* spp. no presentan diferencias estadísticas entre sus tratamientos, sin embargo no hay efectos negativos de las bacterias en el establecimiento de la simbiosis micorrícica.

En las plantas sin *Meloidogyne* spp. tanto en la población de esporas como en el porcentaje de colonización micorrícica, existen diferencias estadísticas significativas en la interacción H1P2 respecto a los demás tratamientos, alcanzando la mayor media poblacional.

4 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que la interacción entre HMA y *P. putida* disminuye el daño y la infección causada por *Meloidogyne* spp. en tomate de árbol.

Existe un efecto de protección en las plantas infectadas con *Meloidogyne* spp. al aplicar HMA y *P. putida*, donde se reduce la reproducción y el agallamiento del parásito.

Los microorganismos rizosféricos utilizados en el presente estudio, demostraron tener un efecto positivo sobre el desarrollo de las plantas y la protección contra nematodos por lo que pueden ser consideradas organismos con potencial, dentro del área de control biológico.

Se recomienda efectuar pruebas *in-vitro* de diferentes cepas de *P. putida* con capacidad de producir metabolitos secundarios como sideróforos y antibióticos, para la selección de rizobacterias como agentes de biocontrol.

REFERENCIAS

1. Abad P., Favery B., Rosso M., Castagnone-Sereno P. (2003). Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology* 4 (4): 217–224.
2. Azcón-Aguilar, C. Bagó, B. (1994). Physiological characteristics of the host plant promoting and undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. ALS, Birkhauser, Basel, Switzerland, pp 47-60.
3. Azcón-Aguilar C, Barea JM. (1996). Arbuscular mycorrhizal and biological control of soil-borne plant pathogens. An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464.
4. Barea, J (1991). Vesicular Arbuscular Mycorrhizae as Modifiers of Soil Fertility. Stewart, B (ed). *Advances in soil science*, 15.
5. Barea, J.M., Andrade, G., Bianciotto, V., Dowling, D., Lohrke, S., Bonfante, P., O'gara, F. y Azcón, C. (1998). Impact on arbuscular mycorrhizal formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for the biocontrol of soilborne plant fungal pathogens. *Applied Environmental Microbiology*. 64: 2304-2307.
6. Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., Azcón, R. 1997. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil plant systems. In: Gange AC, Brown VK (Eds) *Multitrophic interactions in terrestrial systems*. Blackwell Science, Oxford, pp. 65-77.
7. Bago, B., Azcón, C. 1997. Changes in the rhizospheric pH induced by arbuscular mycorrhizal formation in onion (*Allium cepa* L.). *Z Pflanzenernähr Bodenk*. 160: 333-339.
8. Bowen, G., Rovira, A. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Agron*. 66, 1-102
9. Choudhary, D.K., Prakash, A., & Johri, B.N. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol*. 47: 289-297
10. FAO. 1991. Producción agrícola sostenible: consecuencias para la producción agraria internacional. Estudio FAO Investigación y Tecnología 4. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. pp: 1- 46.
11. Hernández, A. Heydrich, M., Velázquez. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Fitopatología*, 24, 42-49.
12. Herrera-Peraza R., Furrazola E, Ferrer R., Fernández R. y Torres Y. (2004). Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario. Cuba. Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 35: 113-123.

13. INIAP. (2008). Editores: Aida Villavicencio y Wilson Vásquez. Guía técnica de cultivo. Manual No. 73. Quito-Ecuador.
14. Jaizme-Vega. Azcón, R. (1995) Response of some tropical and subtropical cultures to Endomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 5:213-217.
15. Jaizme, M.C., Tenoury, P., Pinochet, J. y Jaumot, M. 1997. Interactions between the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Glomus mosseae* in banana. *Plant and Soil*. 196: 27-35.
16. Jaizme-Vega MC, Rodríguez-Romero AS, Barroso Núñez LA. 2006. Effect of the combined inoculation of two arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on papaya (*Carica papaya* L.) infected with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Fruits* 61: 151-162.
17. Jayaprakashvel, M., Mutheszilan, R., Srinivasan, A., Jaffar H., Gobalakrishnan, S., Jacky, B., Kaarthikeyan, C., Muthulakshmi R. (2010). Hydrogen Cyanide Mediated Biocontrol Potential of *Pseudomonas* sp. AMET1055 Isolated from The Rhizosphere of Coastal Sand Dune Vegetation. *Advanced Biotech*, 9, 39-42.
18. Kloepper, J., Tuzun, S., Zehnder, G., y Wei, G. 1997. Multiple Disease Protection by Rhizobacteria that Induce Systemic Resistance historical Precedence. *Phytopathol* 87:136–137.
19. Phillips, J.M., Hayman, D.S. 1970. Improved procedure for cleaning roots and staining parasitic and Vesicular-Arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 5: 158-161.
20. Rodríguez-Romero, A., Badosa, E., Montesinos, E. and Jaizme-Vega, M. (2007), Growth promotion and biological control of root-knot nematodes in micropropagated banana during the nursery stage by treatment with specific bacterial strains. *Annals of Applied Biology*, 152: 41–48.
21. Schippers B., Baakker, A.W., Van Peer. (1990). Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. *Plant and Soil*, 129. 75-83.
22. Siddiqui, Z. A., Akhtar, S. (2006). Effects of AM fungi and organic fertilizers on the reproduction of the nematode *Meloidogyne incognita* and on the growth and water loss of tomato. *Biol Fertil Soils*, 43, 603–609.
23. Siddiqui, Z. (2004) Effect of plant growth promoting bacteria and composted organic fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and tomato growth. *Bioresour Technol* 95:223–227
24. Siddiqui, Z. A., Iqbal, A., Mahmood, I. (2001) Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Appl Soil Ecol* 16:179–185
25. Siddiqui, Z. A., Mahmood, I. (1995) Role of plant symbionts in nematode management: a review. *Bioresour Technol* 54:217–226
26. Siddiqui, Z. A., Mahmood, I. (1998) Effect of a plant growth promoting bacterium, an AM fungus and soil types on the morphometrics and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. *Appl Soil Ecol* 8:77–84
27. Siddiqui, Z. A., Mahmood, I., Khan, M.W. (1999) VAM fungi as prospective biocontrol agents for plant parasitic nematodes. *Modern approaches and innovations in soil management*. Rastogi, Meerut, India, pp 47–58

28. Siddiqui, Z. A., Mahmood, I. (2001). Effects of rhizobacteria and root symbionts on the reproduction of *Meloidogyne javanica* and growth of chickpea. *Bioresource Technology* 79. 41-45
29. Siddiqui, Z.A., Ashi, Q., Akhtar, S. (2009): Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates on *Pisum sativum*, *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 42:12, 1154-1164
30. Soria N., Padilla F., Larrea G. (1995). Guía para el cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) 1-23.
31. Smith, S. E., Read, D. J. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. San Diego: Academic Press. 89-95.
32. Tahat, M., Kamaruzaman, S., Othman, R. 2010. Mycorrhizal Fungi as a Biocontrol Agent. *Plant Pathology Journal*, 9: 198-207.
33. Tenuta, M. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: prospects for increasing nutrient acquisition and disease control. Department of soil science, University of Manitoba. 76-82.
34. Wehner, J., Antunes, P., Powell, J., Mazukatow, J. Rillig M. 2009. Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity? *Pedobiologia*. 53:197-201.
35. Zuckerman B., Mal W. y Harrison M. (eds) (1985). *Fitonematología: Manual de Laboratorio. Centro Agronómico Tropical de Investigaciones y Enseñanza (CATIE)*.